

METHOD AND DEVICE FOR MEASURING CONCENTRATION OF ANALYSIS OBJECT BY UTILIZING AMPEROMETRIC SENSOR

Publication number: JP8304340

Publication date: 1996-11-22

Inventor: MAABIN EE GENSHIYAA; DEJIYA FUWAN;
MASHIYUU KEE MUSHIYOO; KINNFIUAI ITSUPU
Applicant: BAYER AG

Classification:

- international: G01N33/483; C12Q1/00; G01N27/327; G01N27/416;
G01N27/48; G01N33/66; G01N33/72; G01N33/92;
G01N33/483; C12Q1/00; G01N27/327; G01N27/416;
G01N27/48; G01N33/66; G01N33/72; G01N33/92;
(IPC1-7): G01N33/483; G01N33/66; G01N33/72;
G01N33/92; G01N27/48; G01N27/327; G01N27/416

- European: C12Q1/00B4

Application number: JP19960110631 19960501

Priority number(s): US19950435993 19950505

Also published as:

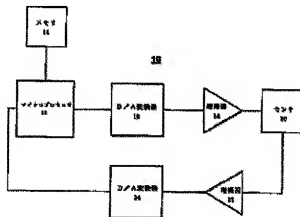
EP0741186 (A2)
US5653863 (A1)
US5620579 (A1)
EP0741186 (A3)
EP0741186 (B1)

more >>

Report a data error here

Abstract of JP8304340

PROBLEM TO BE SOLVED: To enhance the accuracy of measurement by oxidizing a reductive medium produced during preservation of a sensor by applying a potential to the electrodes. **SOLUTION:** The inventive method suppresses the background shift due to oxidizable impurities in an amperometric sensor being used for measuring a specified object, e.g. glucose, in blood. When such a sensor is preserved for a long term or under stress (heat or moisture), reduced media or impurities, e.g. enzyme stabilizer, increases to cause increase of background current of sensor 20. Effect of increased background current is minimized by previously applying a positive potential pulse to the electrodes and oxidizing at least a part of the media before making a measurement. More specifically, a digital data from a microprocessor 12 is applied to a D/A converter to produce an analog signal which is then amplified through an amplifier 18 and applied to the sensor 20.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

特開平8-304340

(43) 公開日 平成 8 年(1996)11月22日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所	
G 0 1 N	27/48		G 0 1 N	27/48	Z
	27/327			33/483	F
	27/416			33/66	C
// G 0 1 N	33/483			33/72	B
	33/66			33/92	A
審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 11 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号	特開平8-110631	(71) 出願人	391007079 バイエルコーポレーション アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、 エルクハート、マイルス・アベニュー 1884
(22) 出願日	平成 8 年(1996) 5 月 1 日	(72) 発明者	マービン・エー・ゲンシャー アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、 エルクハート、ネフ・ストリート 2905
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 3 5 9 9 3	(72) 発明者	ディジャ・フワン アメリカ合衆国、インディアナ州、46530、 グレンジャー、バドック・ドライブ 51786
(32) 優先日	1995 年 5 月 5 日	(74) 代理人	弁理士 津国 肇 (外 1 名)
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アンペロメトリックセンサを利用して分析対象物の濃度を測定する方法および装置

(57) 【要約】

【課題】 アンペロメトリックセンサを利用して流体試料中の分析対象物の濃度を測定する際に、センサの保存時に生じた還元型の媒介物に起因する測定誤差を減少させる手段の提供。

【解決手段】 予め酸化電位を電極間に印加して、保存中に還元型に変化した媒介物の少なくとも一部を酸化型に戻してから、実際の測定を行う方法および装置。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析対象物に対して特異的な酵素と、該分析対象物と該酵素との反応に充当して還元されるものであり、部分的な還元をすでに受けている媒物とを含む組成物をその表面に有する基準電極と、電気化学的に接続した作用電極の表面に流体試料を適用する工程；および周囲条件下でのセンサの保存期間内および電流測定期間前の期間に生じた還元型の該媒物の量に起因するものであり、かつ作用電極と基準電極との間に十分な電位を印加してそれから秒単位の期間内に還元型の該媒物を酸化することにより作用電極で測定される、作用電極と基準電極との間の電流を測定する工程により、流体試料中を通過する電流の関数として流体試料中の分析対象物の濃度を測定する、分析対象物の濃度を測定する方法において、電極間に酸化電位を印加して該媒物の少なくとも一部をその酸化型に戻す工程；および系を閉回路または電流*

*を実質的に減らす電位に切り換えて、設定した遅延期間中、作用電極における電気化学的応答速度を最小限にしたのち、第二の電位を電極間に印加し、流体試料中に発生した電流を測定する工程を含む、分析対象物を高精度で測定し得る、分析対象物の濃度を測定する方法。

【請求項2】 a) 正のパルスを印加する間に電流 (i_1) を測定し、第二の電位の印加の最後で電流 (i_2) を測定し、

b) 式

【数1】

$$G = \frac{i_2 - \text{Int}}{\text{slope}} - K \cdot \Delta(i_1, i_2)$$

(ただし、Int およびslope は i_2 の切片および傾きであり、Kは選択した偏り換算係数であり、 $\Delta(i_1, i_2)$ は、式

【数2】

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{\text{Int}}{\text{slope}} \cdot \left(\frac{\text{slope} \cdot i_1 - s_1 \cdot i_2}{\text{slope} \cdot i_{1-10} - s_1 \cdot i_{2-10}} - 1 \right)$$

(ただし、 $s_1 = i_1$ の傾きであり、

i_{1-10} = 低い分析対象物濃度での i_1 であり、

i_{2-10} = 低い分析対象物濃度での i_2 である) によって計算される、バックグラウンド偏りに比例する誤差補正項である) を解くことによって、補正された分析対象物量Gを計算することにより、分析対象物測定の精度をさらに高める、請求項1記載の方法。

【請求項3】 該媒物がフェリスアン化物物である、請求項1記載の方法。

【請求項4】 該分析対象物がグルコースである、請求項2記載の方法。

【請求項5】 該酸化電位を印加したのち該第二の電位を印加する前に、選択された遅延期間を設定する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】 該酸化電位を電極間に印加する工程が、0.1ボルト〜0.9ボルトの範囲で選択的に設定した電圧電位を印加する工程と、測定電流を限界値と比較する工程と、該限界値より大きい測定電流に反応して、該電圧電位が所定時間印加されたかどうかを確認する工程とを含む、請求項1記載の方法。

【請求項7】 該所定時間が、5秒〜15秒の範囲で選択的に設定される、請求項6記載の方法。

【請求項8】 選択された遅延期間を設定する工程が、※

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{\text{Int}}{\text{slope}} \cdot \left(\frac{\text{slope} \cdot i_1 - s_1 \cdot i_2}{\text{slope} \cdot i_{1-10} - s_1 \cdot i_{2-10}} - 1 \right)$$

(ただし、 $s_1 = i_1$ の傾きであり、

i_{1-10} = 低い分析対象物濃度での i_1 であり、

i_{2-10} = 低い分析対象物濃度での i_2 である) のように計算される、バックグラウンド偏りに比例する誤差補正

※第二の電位を印加する前に10秒〜40秒の範囲で選択される遅延期間待機する工程を含む、該電流を測定する工程の前に、5秒〜10秒の範囲で選択される期間、該第二の電位を印加する、請求項5記載の方法。

【請求項9】 分析対象物に対して特異的な酵素と、該分析対象物と該酵素との反応に充当して還元されるものであり、周囲条件下により部分的な還元をすでに受けている媒物とを含む組成物をその表面に有する作用電極の表面に流体試料を適用することにより、流体試料中の分析対象物の濃度を測定する方法において、

a) 正の電位パルスを該電極に印加して、該媒物の少なくとも一部を酸化してその酸化型に戻す工程；

b) 正のパルスの印加中電流 (i_1) を測定し、第二の電位の印加の最後で電流 (i_2) を測定する工程；および

c) 式

【数3】

$$G = \frac{i_2 - \text{Int}}{\text{slope}} - K \cdot \Delta(i_1, i_2)$$

(ただし、Int およびslope は i_2 の切片および傾きであり、Kは選択した偏り換算係数であり、 $\Delta(i_1, i_2)$ は、

【数4】

項である) を解くことによって、補正された分析対象物濃度Gを計算する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項10】 該媒物がフェリスアン化物物である、請求項9記載の方法。

3

【請求項11】 該分析対象物がグルコースである、請求項10記載の方法。

【請求項12】 試料中の分析対象物を測定するための装置であって、

試料を受け入れるためのアンペロメトリックセンサ手段と、

第一のバーンオフ (burn off) 電圧電位を該アンペロメトリックセンサ手段に印加し、第二の読取り電圧電位を該アンペロメトリックセンサ手段に印加するための電圧電位手段と、

バーンオフ期間および読取り期間を識別するためのタイマ手段と、

該印加されたバーンオフ電圧電位に起因する第一の電流 i_1 : および該印加された第二の読取り電圧電位に起因する第二の電流 i_2 : を測定するための手段と、

該電流測定手段に答じて、試料の分析対象物値を識別*

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{Int}{slope} \cdot \left(\frac{slope \cdot i_1 - s_1 \cdot i_2}{slope \cdot i_1 - s_1 \cdot i_2} - 1 \right)$$

(ただし、 i_1 は、該第一のバーンオフ電圧電位の最後で測定される電流を表し、 i_2 は、該第二の読取り電圧電位の最後で測定される電流を表し、 Int 、 $slope$ 、 $i_1 - i_2$ 、 $i_2 - i_1$ および s_1 は、該アンペロメトリックセンサ手段に関する該所定の特性パラメータ値を表す) によって表される、請求項15記載の装置。

【請求項17】 該分析対象物がグルコースであり、該識別される分析対象物値が、式

【数6】

$$G = \frac{i_2 - Int}{slope} - K \cdot \Delta(i_1, i_2)$$

(ただし、 K は、 $0 \sim 1$ の値を有する選択した偏り換算係数である) によって表される、請求項16記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、一般的にはバイオセンサに関し、より詳細には、アンペロメトリックセンサにおける偏り (bias) を減少させるための新規で改良された方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】 体液中の分析対象物の定量は、特定の生理的異常の診断および治療に非常に重要である。例えば、特定の個人においては血糖、コレステロールおよびビリルビンを監視すべきである。特に、食事におけるグ*

グルコース + O₂ →

(A)

【0005】 測色検定においては、放出された過酸化水素が、ペルオキシダーゼの存在において、試験流体中の

4

*する手段とを含むことを特徴とする装置。

【請求項13】 該タイマ手段が、遅延期間を識別するための手段を含み、かつ該電圧電位手段が、該タイマ手段に答じて該第二の読取り電圧電位を印加する、請求項12記載の装置。

【請求項14】 該アンペロメトリックセンサ手段に関する所定の特性パラメータ値を記憶するための手段と、該第一の電流 i_1 : と該第二の電流 i_2 : の測定手段に答じて、偏り補正値を計算する手段とをさらに含む、請求項12記載の装置。

【請求項15】 該識別手段が、該偏り補正値計算手段に答じて、該分析対象物値を測定する、請求項13記載の装置。

【請求項16】 該計算された偏り補正値が、

【数5】

※グルコースの摂取を規制する手段として体液中のグルコース濃度を頻りにチェックしなければならない糖尿病患者個人にとって、体液中のグルコースの測定は非常に重要である。以下の本明細書の開示内容の残りはグルコースの測定に当てられるが、本発明の方法および装置は、適切な酵素の選択をもつて、他の分析対象物の測定にも応用することが理解されよう。体液中のグルコースの検出に用いるための理想的な診断装置は、試験を管理する技術者側に高度な技術を要求しないよう、簡単なものでなければならない。多くの場合、これらの試験は患者によって管理され、そのことが、実施しやすい試験の必要性をさらに強調する。さらには、このような装置は、長期的な保存状態を満足するのに十分な安定性をもつ要素に基づくべきである。

【0003】 流体中の分析対象物濃度を測定する方法は、分析対象物、その分析対象物に特異的な酵素およびその酵素をその最初の酸化状態 (酸化型) に維持する媒介物との間の電気化学的反応に基づくことができる。適当な酸化還元酵素には、オキシダーゼ、デヒドロゲナーゼ、カタラーゼおよびペルオキシダーゼがある。例えば、グルコースが分析対象物である場合、グルコースオキシダーゼおよび酸素との反応は式 (A) によって示される。

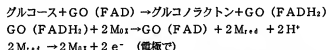
【0004】

【化1】

グルコース濃度に比例して酸化還元指示薬の変色を生じさせる。酸化還元指示薬の変色を既知のグルコース濃度

の試験流体を用いて得られた変色と比較するための色標を使用することにより、測色試験を半定量的にすることができ、また、分光光度計を用いて結果を読み取ることにより、より定量的にすることができるが、その結果は一般に、バイオセンサを使用する場合ほど正確でもないし速やかに得られるものでもない。本明細書に使用する「バイオセンサ」とは、適当な試料中の分析対象物に対して選択的に応答し、生物学的認識信号と物理化学的トランスデューサーとの組み合わせにより、その濃度を電気信号に変換する分析装置をいう。その比較的高い精度は別として、バイオセンサは、電気信号を直接発し、それにより、簡略化された設計を容易にする機器である。原則的に、バイオセンサが行うべきすべてのことは、時間を計測し、電流を読み取ることである。さらには、薄い化学物質の層が電極に付着し、材料がほとんど消耗しないため、バイオセンサは材料費が安い利点を提供する。

【0006】上記式(A)を参照すると、適当な電極が、式Bに従った試験流体中への電極の導入により、H₂O₂の生成を測定することができる。

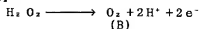


【0011】式中、GO (FAD) はグルコースオキシダーゼの酸化型を表し、GO (FADH₂) はその還元型を示す。媒介体Mox/M_{ox}は、還元型の酵素から電極に電子を移し、それにより酵素を酸化させて、その場でそれを再生させる。これは当然、経済性な理由から望ましい。媒介物を使用する主な目的は、センサの作用電位を下げることである。理想的な媒介物は、電極において、化学物質層における不純物および試料中の干渉物質が酸化されず、それにより、干渉が最小になるような低い電位で再酸化されるものであろう。

【0012】多くの化合物が、還元型の酵素から電子を受容し、その電子を電極に移すそれらの能力により、媒介物として有用である。分析定量における電子移動剤として有用であることが知られる媒介物には、米国特許第4,766,607号明細書に開示された置換ベンゾキノンおよびナフトキノン類；欧州特許第0354441号明細書に具体的に開示されたN-オキシド、ニトロ化合物、ヒドロキシルアミン類およびオキシミン類；欧州特許第0330517号明細書に開示されたフラビン類、フェナジン類、フェノチアジン類、インドフェノール

* 【0007】

【化2】



【0008】そして、この電子の流れを、グルコース濃度と直接関連する電気信号に変換する。

【0009】式(A)によって示される反応の初期段階では、試験試料中に存在するグルコースが、酵素の酸化フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 中心をその還元型 (FADH₂) に変換する。これらの酸化還元中心は本質的に酵素分子内で電気絶縁されているため、従来の電極の表面への直接的な電子の移動は、許容不可能な高い槽電圧を用いなければならない。計測可能な程度には起こらない。この系に対する改良は、電極と酵素との間の非生理的酸化還元カップリングを使用して、(FADH₂)と電極との間で電子をシャトルさせることを含む。これを次式によって示す。式中、通常は媒介物と呼ばれる酸化還元カップラをMで示す。

【0010】

* 20

※ル類、置換1,4-ベンゾキノン類およびインダミン類ならびに米国特許第3,791,988号明細書に開示されたフェナジニウム/フェノキジニウム塩がある。生物学的酸化還元系の電気化学的媒介物の包括的考察を、Analytica Clinica Acta. 140 (1982) の1~18頁に見いだすことができる。

【0013】比較的古くから用いられてきた媒介物には、Schlapfer らにより、Clinica Clinica Acta. 57 (1974) の283~289頁に論じられている、フェリシアン化物としても知られるヘキサシアノ鉄 (III) 酸塩がある。米国特許第4,929,545号明細書には、可溶性フェリシアン化合物を可溶性第二鉄化合物と組み合わせた組成物を使用して、試料中の分析対象物を酵素的に測定することが開示されている。式(A)において、鉄塩であるフェリシアン化物により酸素を置き換えると、フェリシアン化物がグルコースオキシダーゼ酵素から電子を受容することによってフェロシアン化物に還元されるため、次のようになる。

【0014】

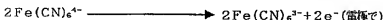
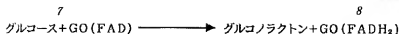
【化3】



【0015】この反応を表すもう一つの方法は、以下の式(C)の使用による。

【0016】

【化4】



(C)

【0017】放出される電子は、試験流体中のグルコースの量に直接的に等しく、電位を流体に印加したときその中に発生する電流を測定することにより、グルコースの量に相関させることができる。陽極でのフェロシアン化物の酸化がこのサイクルを再び始める。

【0018】上記から明らかなように、媒介物の必要な属性は、センサの使用の前に電極面に存在する条件のもとで酸化状態（酸化型）にとどまる能力である。媒介物の還元はバックグラウンド電流を増して、結果的にバイオセンサの読取り値を偏らせる。これらの媒介物は、特にストレスの条件下で時間とともに還元し、それにより、それらが適用されるセンサの有用性を減らす傾向をもつことが見いだされた。

【0019】国際出願PCT/US92/01659号明細書には、測色試薬スリッパ中の酸化剤としてのニクロム酸カリウムの使用が開示されている。この酸化剤の目的は、他の試薬成分中の不純物を酸化させて、測色センサの安定性を改善することにある。この公開出願は、米国特許出願第07/451,671号（現在米国特許第5,288,636号）に言及し、還元された媒介物を電位の印加によって再酸化し、一定期間後に電流を測定して分析対象物の濃度を測定する装置を記載したものとして特徴づけている。具体的には、米国特許第5,288,636号記載のものは、グルコースオキシダーゼによるグルコースの完全な酸化を必要とする。酵素がグルコースによって還元されるとき、フェリシアン化物が酵素と反応してフェロシアン化物を生成する。この酵素反応によって生成されるフェロシアン化物は、貯蔵中に生成するフェロシアン化物と一緒にいる。この後者のフェロシアン化物は、フェリシアン化物と、グルコースオキシダーゼおよびフェリシアン化物とともに付着した物質に見られる不純物との反応の結果である。米国特許第5,288,636号記載のものは、生成されるフェロシアン化物をこれらの2種の源の間で区別していない。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】電極表面に貯蔵された媒介化合物の望ましくない還元を逆の状態にし、非常に低い濃度の分析対象物を含む流体試料中の分析対象物の数値の評価に対して、それが及ぼす影響を最小限にする

方法を提供することが望ましく、それが本発明の目的である。

【0021】さらなる目的は、分析対象物測定の精度を高める方法を提供することにある。

【0022】さらなる目的は、分析対象物がグルコースである方法を提供することにある。

【0023】さらなる目的は、分析対象物測定の精度をさらに高めるための数学的手段を提供することにある。

【0024】さらなる目的は、分析対象物値を正確に測定するための装置を提供することにある。

【0025】さらなる目的は、製造するのが簡単かつ低価格である装置を提供することにある。

【0026】

【課題を解決するための手段】本発明は、試料を作用電極の表面に適用することにより、流体試料中の分析対象物の濃度を測定する方法を含む。電極は、分析対象物に対して特異的な酵素と、分析対象物と酵素との反応の結果として還元される媒介物を含む組成物をその表面に有している。媒介物は、周囲条件下で曝された結果として、その還元型へと部分的な還元を受けている。本明細書には、

a) 正の電位パルスを電極に印加して、媒介物の少なくとも一部をその酸化型に酸化する工程を含む、方法に対する改良が開示される。この工程が電極におけるバックグラウンド偏りを減らす。バックグラウンド偏りは、

a) 正のパルスを印加する間に電流 (i_1) を測定し、読取り期間の最後で電流 (i_2) を測定し、

b) 以下の式 (1) を解くことによって、補正された分析対象物濃度 G を計算することにより、さらに減らすことができる。

【0027】

【数7】

$$G = \frac{i_1 - \text{Int}}{\text{slope}} - K \cdot \Delta(i_1, i_2) \quad (1)$$

【0028】ただし、Int および slope は i_2 の切片および傾きであり、 $\Delta(i_1, i_2)$ は、次のように計算される、バックグラウンド偏りに比例する誤差補正項である。

【0029】

【数8】

9

10

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{\text{Int}}{\text{slope}} \cdot \left(\frac{\text{slope} \cdot i_1 - s_1 \cdot i_2}{\text{slope} \cdot i_1 - i_0 - s_1 \cdot i_2 - i_0} - 1 \right) \quad (2)$$

【0030】ただし、 $s_1 = I_1$ の傾きであり、 $i_1 - i_0$ = 低い分析対象物濃度での i_1 であり、 $i_2 - i_0$ = 低い分析対象物濃度での i_2 であり、 K = 選択した換算係数である。

【0031】

【発明の実施の形態】本発明は、血液中の特定の分析対象物、例えばグルコースを測定するのに使用されるアンペロメトリックセンサ中の酸化され得る不純物によるバックグラウンド偏りを減らす方法である。このようなセンサが長期間またはストレス（熱、湿気など）下で保存されるならば、還元された媒質またはセンサ中に存在する他の還元された不純物、例えば酵素安定剤、例えばグルタメートおよび同等な還元性を有する界面活性剤の増加により、センサのバックグラウンド電流が増す。例えば、フェリシアン化物ベースのアンペロメトリックセンサにおいては、バックグラウンド偏りは、電極面の近くのフェロシアン化物（フェリシアン化物の還元から生じる）の存在に関係する。この蓄積したフェロシアン化物は、センサの使用中に生じるフェロシアン化物（新しいフェロシアン化物）とは反対に、酸化されてフェリシアン化物に戻り、それが生じさせるバックグラウンド偏りを減らし、それにより、センサの保存寿命を延ばす。この目的を達成するため、本方法は電気化学的アプローチを用いる。電気化学的アプローチをアルゴリズム補正によって補強すると、バックグラウンド偏りはさらに減る。

【0032】図1を参照すると、本発明の方法は、まず、センサの使用途中での通常の電位プロファイルの前に、正の電位パルス（「バーンオフ」パルスと呼ぶ）を印加することを含む。これは通常、0.1〜0.9ボルト（好ましくは0.3〜0.7ボルト）の正の電位をセンサの作用電極と基準電極との間に1〜15秒間（好ましくは5〜10秒間）印加することによって達成される。このバーンオフパルスがもたらあるフェロシアン化物（または他の酸化され得る不純物）を酸化させて、センサがクリーンなバックグラウンドで検定を始められるようにする。通常は、酸化され得る不純物の一部しかバーンオフパルスによって酸化されないため、バックグラウンドは完全にクリーンであるとはいえない。理由は、化学物質の層が作用電極および基準電極の両方を覆っているからである。もたらあるフェロシアン化物は、フェリシアン化物から生まれるため、化学物質の層の中に存在する。試料液体を適用し、化学物質層が再び湿潤すると、作用電極の近くのフェロシアン化物が再び酸化される。フェロシアン化物の残りは試料液体中に拡散し、グルコースと混合する。もたらあるフェロシアン化物のそのような部分は、グルコースに影響を及ぼす

ことなく再び酸化されることはない。もたらあるフェロシアン化物は、液体試料が適用されたのち非常に短い時間（数秒間）だけ電極の近くにとどまる。この理由は、化学物質（酵素およびフェリシアン化物など）が導層として作用電極および基準電極に付着しているからである。バーンオフ法はこれを利用している。理由は、液体試料中の分析対象物の濃度を顕著に下げることなく、その大部分が電極と直接接触しないもたらあるフェロシアン化物の有意量を酸化することができるからである。実験は、バーンオフパルスの適切な印加により、ストレスを受けたセンサのバックグラウンド偏りを40%減らすことができることを実証した。

【0033】バックグラウンド偏りは、バーンオフパルスとともに作用するバックグラウンド補正アルゴリズムの使用により、さらに減らすことができる。このアルゴリズムは二つの電流読取り値の記録に基づく。第一の読取り値（ i_1 ）はバーンオフパルスの期間中に記録され、第二の読取り値（ i_2 ）は、読取り期間、すなわち、第二の電位パルスが印加された瞬間から電流 i_1 が測定される瞬間までの経過時間の最後で記録される。読取り期間の長さは、図1に示すように $t_1 - t_2$ である。そして、二つの電流読取り値 i_1 および i_2 から分析対象物の濃度を計算する。センサに対して実施した実験は、バックグラウンド補正アルゴリズムが残りのバックグラウンド偏りの少なくとも80%を除くことができ、その結果、センサの安定性を改善して保存寿命の有意な延長をもたらすことができることを証明した。

【0034】本発明の実施に有用であるタイプのアンペロメトリックグルコースセンサは、次のように製造される。2個の炭素電極をポリマー基板上にプリントする。次に、化学物質成分の層を電極に付着させ、乾燥させる。好ましい化学組成物は、フェリシアン化物（カリウム塩）5.5mM、グルコースオキシダーゼ8.5単位、ポリ（エチレンオキシド）0.53%、界面活性剤としてのcremophor 0.40%およびpH7.2のリン酸緩衝液8.3mMを含有する媒体5μlである。グルコース検定の際、三つの連続期間からなる電位プロファイルをセンサに印加する。これらの期間は、順に、バーンオフ期間（通常は0.4ボルトで10秒間）、遅延期間（開回路で15秒間）および読取り期間（0.4ボルトで5秒間）である。遅延期間の厳密な長さは重要ではないが、通常は10〜40秒の範囲である。この遅延期間が、十分なフェロシアン化物を蓄積する反応にとって十分な時間を与え、そのフェロシアン化物の再酸化から生じる電流が難く測定可能となる。これらの期間を、電位および電流を時間に対してプロットした図1に示す。電流測定をバーンオフ期間の最後（ i_1 ）および読取り期間の最

11

後 (i₂) の最後で実施し、次に式1を使用して、相当するグルコース濃度を計算する。式中の定数、例えば傾きおよび切片は所定の値である。

【0035】以下の説明は、流体試料中のグルコースが検出すべき分析対象物であり、かつセンサ中の媒介物がフェリシアン化物であるものに関する。しかし、この説明は、他の分析対象物を測定するための系、および酸化される種がフェロシアン化物以外のものである系にも同等に当てはまる。

【0036】バーンオフ法、すなわち、正の電位パルス電極に印加して媒介物の少なくとも一部を酸化させてその酸化型に戻す技法を図1に示す。電位および電流のプロファイルをプロットした図1では、タイミングは次のとおりである。

【0037】t₀ : 試料を検出し、バーンオフ期間が始まる。試料は、センサを機器に挿入して0.4ボルトの電位をただちに印加することによって検出される。所定の限界値 (例えば250nA) を超える値が測定されたかどうかを見るため、電流を継続的にチェックする。限界値を超える電流が検出されると、試料が検出されたことになりバーンオフ期間が開始する。

【0038】t₁ : バーンオフ期間が終了し、ここで電流 i₁ を測定する。バーンオフ期間の長さ t₁ - t₀ は普通5〜10秒である。電位は t₁ では0.4ボルトであるが、バーンオフ期間後に設定した遅延期間の間、開*

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{\text{Int}}{\text{slope}} \cdot \left(\frac{\text{slope} \cdot i_1 - s_1 \cdot i_2}{\text{slope} \cdot i_1 - i_0 - s_1 \cdot i_2 - i_0} - 1 \right) \quad (2)$$

【0046】式1は、ストレスに関連するバックグラウンド偏りを減らすことと、系の精度を保持することとの間で妥協を達成するための部分補正アルゴリズムである。基本的な方法は、i₂ をグルコース読取り値として使用することである。

【0047】

【数11】

$$G = \frac{i_2 - \text{Int}}{\text{slope}}$$

【0048】ただし、int および slope は、それぞれ i₂ の切片および傾きである。項 Δ (i₁ , i₂) は、電流 i₁ および i₂ から導出した、ストレスまたは他の原因によるバックグラウンドの推定増分である。新しいセンサの場合、この項は0に近い。パラメータKは、選択的に提供されるか、0〜1の値に設定される。Kを0に設定するならば、バックグラウンド補正は得られない。他方、Kを1にするならば、最大の補正を達成することができる。同じグルコース濃度のもとで多数のセンサを試験する場合、i₁ の変動が i₂ の変動よりも大きいことがわかったため、以下の例では、Kを0.8に設定して部分的補正を求める。i₂ のみから計算したグルコース値、すなわち式(1)でK=0とした場合と比較する

12

* 回路に切り換わるか、電流を実質的に減らす電位に切り換わって、作用電極での電気化学反応の速度が最小限になる。

【0039】t₂ : 設定した遅延期間が終了。待機期間の長さ t₂ - t₁ は通常10〜40秒である。0.4ボルトの読取り電位が t₂ で印加される。

【0040】t₃ : 読取り期間が終了し、ここで電流 i₂ を測定する。読取り期間の長さ t₃ - t₂ は5〜10秒である。

【0041】バーンオフパルス、すなわち t₀ から t₁ までの0.4ボルト電位の印加は、もともとあるフェロシアン化物 (蓄積した鉄) または酵素層中の他の酸化され得る干渉体の一部を除去するために設けられている。

【0042】バーンオフアルゴリズムが式1を用いて二つの電流測定値 i₁ および i₂ からグルコース濃度を計算する。

【0043】

【数9】

$$G = \frac{i_2 - \text{Int}}{\text{slope}} - K \cdot \Delta(i_1, i_2) \quad (1)$$

【0044】ただし、

【0045】

【数10】

と、i₁ と i₂ とを合わせて計算されるグルコース値は、精度がわずかに低く (標準偏差がより大きい)、当然、バックグラウンド偏りがはるかに小さい。精度と偏りとの間の妥協は、適切なK値を選択することによって達成することができる。K=0ならば、バックグラウンド補正は得られず、i₁ は使用されない。この場合、もっとも高い精度が得られるが、高いバックグラウンド偏りが伴う。K=1ならば、最大のバックグラウンド補正が適用され、偏りを最小にすることができるが、精度が犠牲になる。例では、K値を0.8に設定して、精度と偏りとの間で妥協を達成する。

【0049】これらの式におけるパラメータは次のとおりである。

Int : 読取り電流 i₂ の切片、nA

slope : 読取り電流 i₂ の傾き、nA/dL/mg

i₁₋₁ : 低いグルコース標準レベル、すなわち50mg/dL での平均バーンオフ電流 i₁、nA

i₂₋₁ : 低いグルコース標準レベルでの平均読取り期間電流 i₂、nA。実際には、i₂₋₁ は、独立したパラメータではない。これは、Int および slope から計算することができ。

$$i_{2-1} = \text{Int} + \text{slope} \cdot 50$$

s_1 : パーンオフ電流に対する傾き $\text{nA} \cdot \text{dL} / \text{mg}$

K : 部分的補正のために 0.8 に設定

【0050】 Int 、 slope 、 i_{1-10} および s_1 は局所パラメータである。各センサロットは、実験的に決定されるそれ自身のパラメータ値を有している。アルゴリズムは、二つの既知の電流値、すなわち、正常な（ストレスを受けていない）センサの場合、 i_1 を表す値と、 i_2 を表す値とを必要とする。 i_{1-10} および i_{2-10} は、切片 (int) および傾き (s_1 および slope) を決定するのに使用されるため、これらを利用することができる。当然、他のグルコース濃度での電流をアルゴリズムに使用することができる。しかし、これは、二つの追加的な独立したパラメータを加える余分な工程を導入することになる。本発明の手順を以下の実施例によって説明する。

【0051】

【実施例】

$$\text{Int} = i_{2-10} - \frac{50 \cdot (i_{2-10} - i_{2-10})}{350} = 1952.3 - \frac{50 \cdot (8831.7 - 1952.3)}{350} = 969.5 \text{ nA}$$

$$\text{slope} = \frac{i_{2-10} - i_{1-10}}{350} = \frac{8831.7 - 1952.3}{350} = 19.65 \text{ nA} \cdot \text{dL} / \text{mg}$$

$$s_1 = \frac{i_{1-10} - i_{1-10}}{350} = \frac{6003.3 - 1951.2}{350} = 11.58 \text{ nA} \cdot \text{dL} / \text{mg}$$

【0056】 したがって、式 (1) は以下のようになる。 ※ 【0057】

$$G = \frac{i_2 - 969.5}{19.65} - 0.8 \cdot \Delta(i_1, i_2) \quad ※ \quad \text{【数 13】}$$

$$\Delta(i_1, i_2) = \frac{969.5}{19.65} \cdot \left(\frac{19.65 \cdot i_1 - 11.58 \cdot i_2}{19.65 \cdot 1951.2 - 11.58 \cdot 1952.3} - 1 \right) \\ = 0.06162 \cdot i_1 - 0.03631 \cdot i_2 - 49.34$$

【0058】 実施例 II

バックグラウンド補正アルゴリズムを用いなくとも、パーンオフパルスが単独でバックグラウンド偏りを有意に減らすことが見いだされた。

【0059】 この実験では、センサ 10 個に、30℃ および湿度 91% 下で 3 時間ストレスを負荷した。グルコース水溶液 50 mg/dL を試料として使用した。ストレスを負荷したセンサ 5 個を 10 秒間のパーンオフパルスで ★

★ 実施例 I

以下の工程を実施して、アルゴリズムに必要なロットパラメータ値を決定した。

【0052】 A. 低い標準レベル 50 mg/dL で、同一ロットからのセンサ 16 個を試験し、パーンオフ電流および読取り期間電流それぞれの平均電流 i_{1-10} および i_{2-10} を得た。 $i_{1-10} = 1951.2 \text{ nA}$ であり、 $i_{2-10} = 1952.3 \text{ nA}$ であることがわかった。

【0053】 B. 高い標準レベル 4000 mg/dL のセンサ 16 個を試験し、平均電流 i_{1-10} および i_{2-10} を得た。 $i_{1-10} = 6003.3 \text{ nA}$ であり、 $i_{2-10} = 8831.7 \text{ nA}$ であることがわかった。

【0054】 C. パラメータ値を計算した。

【0055】

【数 12】

*

★ 試験し、5 個をこのパルスなしで試験した。加えて、ストレスを負荷していないセンサ 10 個を対照として試験し（5 個を 10 秒間のパーンオフパルスで、5 個をそのパルスなしで試験）、以下の式 (3) を用いて偏りを計算した。

【0060】

【数 14】

$$\text{bias} = \frac{i_{\text{stressed}} - i_{\text{unstressed}}}{i_{\text{unstressed}}} \times 100\% \quad (3)$$

【0061】 偏りは、パーンオフパルスなしの場合で 30.6% であり、パーンオフパルスを用いた場合で 18.0% であることがわかった。このデータは、パーンオフパルスだけでもバックグラウンド偏りが約 40% 減ることを実証する。

【0062】 実施例 III

この実施例では、アルゴリズムがいかにしてバックグラウンド偏りを補正するのかを説明する。

【0063】 センサ 8 個を -20℃ 未満で 2 週間保存し、別の 8 個のセンサに 50℃ で 4 週間ストレスを負荷した。100 mg/dL のグルコース濃度を有する全血を用いて 16 個のセンサすべてを試験した。新しいセンサか

15

らパラメータ値を決定した。次のようにしてグルコース
読取り値Gを計算した。

【0064】 A. バックグラウンド偏り補正アルゴリズム
なし：式1で、K=0

B. 部分的補正：式1で、K=0.8

$$\text{bias} = \frac{G-100}{100} \times 100\% \quad (4)$$

【0067】

※ ※【表1】

表1. 100mg/dL での偏り

	バーンオフ電位を印加しない ときのアルゴリズム	部分的補正 (K=0.8)
-20℃、2週間	3.8%	5.3%
50℃、4週間	64.7%	15.0%

【0068】 本発明を実施することができる装置を図2
に示す。図2を参照すると、符号10によって示され、
本発明の原理にしたがって構築された、分析対象物の値
を正確に測定するための装置のブロック図が示されている。
装置10は、マイクロプロセッサ12をメモリ装置
14とともに含む。マイクロプロセッサ12は、図3に
示す本発明の方法を実行するのに適切にプログラムされ
ている。種々の市販品の装置、例えば、Dallas Seacon
ductor社製のDS5000マイクロコントローラをマイクロプロ
セッサ12およびメモリ14に使用することができる。
メモリ14は、マイクロプロセッサ12の中に組み
込むこともできる。図2に示すように別個に設けるこ
ともできる。

【0069】 マイクロプロセッサ12からのデジタルデー
タがデジタル・アナログ(D/A)変換器16に印加
される。このD/A変換器16がデジタルデータをアナ
ログ信号に変換する。D/A変換器16に結合された増
幅器18がアナログ信号を増幅する。増幅器18で増幅
されたアナログ信号出力はセンサ20に印加される。

【0070】 センサ20は増幅器22に結合されてい
る。感知された増幅信号はアナログ・デジタル(A/
D)変換器24に印加され、この変換器が、増幅された
アナログセンサ信号をデジタル信号に変換する。このデ
ジタル信号がマイクロプロセッサ12に印加される。

【0071】 D/A変換器16、増幅器18および22
ならびにA/D変換器24には、種々の市販品の装置を
使用することができる。例えば、PMI社製の装置タイ
プPM-752F4FSをD/A変換器16に使用することができ
る。増幅器18および22には、Linear Technology社
によって製造、販売される演算増幅器タイプTL074AC
を使用することができる。A/D変換器24には、Maxim
社によって製造、販売される装置タイプMAX135CWIを
使用することができる。

* 【0065】 式4を使用して偏り率を計算した。結果を
表1にまとめる。

【0066】
【数15】

【0072】 さらに図3を参照すると、本発明の正確な
分析対象物測定のための連続工程が示されている。ま
ず、ブロック300に示すように、マイクロプロセッサ
12がバーンオフパルス、例えば0.4ボルトの電位を
センサ20に印加する。次に、判定ブロック302に示
すように、マイクロプロセッサがチェックを行って、検
出されたセンサ限界電流値に相当する試料を識別する。
ブロック302で試料が検出されると、判定ブロック3
04で、所定のバーンオフ期間、例えば10秒を識別す
る。次に、ブロック306に示すように、電流 i_1 を測
定し、ブロック308に示すように、センサ20を開閉
路状態にする。次に、判定ブロック310で、設定され
た遅延または所定の待機期間、例えば15秒を識別す
る。設定された遅延のち、ブロック312に示すよう
に、読取りパルス、すなわち0.4ボルトの電位をセン
サ20に印加する。さらに、判定ブロック314で、読
取りパルスのための所定の読取り期間、例えば5秒を識
別し、ブロック316に示すように、電流 i_2 を測定す
る。次に、ブロック320に示すように、マイクロプロ
セッサ12が、特定のセンサ20に関する、Int、slope、
 i_1 、 i_2 、 i_1-i_2 、S、およびKを含む記憶されたパラ
メータを取得する。そして、ブロック322に示すよう
に、記憶されたパラメータならびに測定されたバー
ンオフ電流 i_1 および読取り電流 i_2 を用いて補正項 Δ
(i_1 、 i_2)を計算する。次に、ブロック324に示す
ように、読取り電流 i_2 と、計算された補正項 Δ (i_1
、 i_2)を選択された換算係数Kで乗じたものを用い
て分析対象物の値、例えばグルコース読取り値Gを計算
する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の方法にしたがって電位および電流を時
間に対して示すグラフである。

【図2】 本発明の方法を実行するのに用いられる、分析

対象物の値を測定するための装置を表すブロック図である。

【図3】本発明による方法にしたがって、図2のプロセッサによって実行される連続工程を示す流れ図である。

【符号の説明】

10 測定装置

12 マイクロプロセッサ

14 メモリ

16 D/A変換器

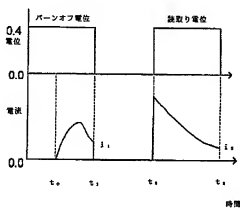
18 増幅器

20 センサ

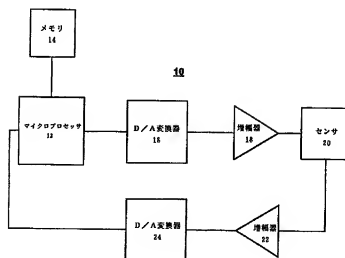
22 増幅器

24 A/D変換器

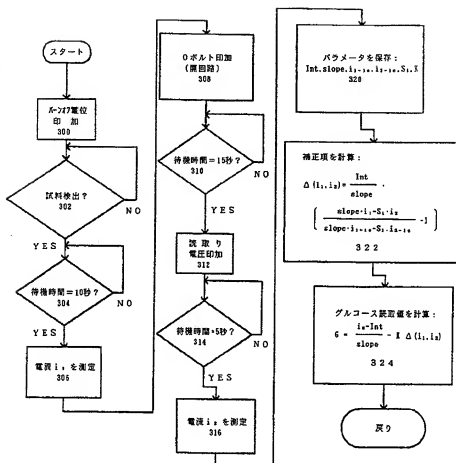
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

G 0 1 N 33/72

G 0 1 N 27/30

3 5 3 R

33/92

27/46

3 3 8

(72)発明者 マシュー・ケー・ムシヨウ

アメリカ合衆国、インディアナ州、46530、
グレンジャー、ノース・フィーズント・コ
ープ・ドライブ 10648

(72)発明者 キン・ファイ・イップ

アメリカ合衆国、インディアナ州、46516、
エルクハート、イースト・ジャクソン・ブ
ールバード 2220